

様式3

令和元年度愛媛大学プロテオサイエンスセンター共同研究報告書

令和2年2月11日

国立大学法人愛媛大学
プロテオサイエンスセンター長 殿

研究代表者

所属機関： 広島国際大学

部局・職名： 保健医療学部 講師

氏名： 中山 寛尚

1. 研究課題

ヒト大腸がんにおける軸索誘導因子 Netrin の発現解析とリガンド・レセプター相互作用検出系の確立

2. 研究組織

| 氏名 | 所属機関・部局 | 職名 | 分担内容 |
|----------------|---------------------------------------|----|------------------------------|
| 研究代表者 中山 寛尚 | 広島国際大学 保健医療学部 | 講師 | 研究計画の立案 大腸癌細胞を使った実験 |
| 研究分担者 福田信治 | プロテオサイエ ンスセンター・ 細胞増殖・腫瘍制 御部門 | 講師 | リガンド蛋白質の作成 リガンド・レセプター結合実験 |

3. 研究成果

別紙のとおり

研究成果報告書

研究代表者

所属機関：広島国際大学

部局・職名：保健医療学部 講師

氏 名：中山 寛尚

研究目的

我々は腫瘍増殖・血管新生の分子メカニズム解析を行っており、近年、軸索誘導因子 netrin-1 とそのレセプターによるシグナルが脳腫瘍および小児髄芽腫の増殖、転移、血管新生、免疫応答を惹起するため、netrin-1 が『癌微小環境制御因子』であること示し、新たな治療標的としての可能性を提唱している (Front Physiol., 2018)。

大腸癌細胞は非常に細胞遊走・浸潤能が高く、血管新生を強力に誘導するため、肺、肝臓、リンパ節などに転移する。そこで我々は、大腸癌の進展に netrin-1 シグナルが影響していると考えている。大腸癌細胞株 6 種および大腸癌患者組織片における netrin-1 リガンドおよびそのレセプター (7 種類) の遺伝子発現解析を行ったところ、細胞株、組織片ともに netrin-1 とレセプターの遺伝子発現が強く“抑制”されていることが明らかとなり、脳腫瘍や髄芽腫のように発現が上昇する結果とは全く異なっていた (中山ら 未発表データ)。

本研究では、1) 大腸癌細胞における netrin-1 関連遺伝子 (リガンド・レセプター) のエピジェネティック制御解析 2) netrin-1 シグナル制御による大腸癌細胞アポトーシス誘導法の確立を目指し、netrin-1 を標的とする新規大腸癌治療法確立を目指すための基礎的検討を行う。

研究内容

(1) bisulfite 法による netrin-1 プロモーター解析

大腸癌の分子発生機序として、DNA のメチル化による癌抑制遺伝子の不活化が明らかとなっている。基礎検討から、netrin-1 とそのレセプター遺伝子群が高頻度にメチル化されている可能性が示唆されたため、netrin-1 プロモーター領域におけるメチル化の程度を bisulfite 法によって解析を行う。

(2) 小麦無細胞発現系とアルファスクリーンを用いたリガンド・レセプターの相互作用検出系の確立

Netrin-1 シグナルを制御するために、netrin-1 とそのレセプターの相互作用を阻害する低分子化合物を探索したい。そのために、netrin-1 リガンドとそのレセプター7種をそれぞれコムギ無細胞タンパク質合成技術によって作成し、その結合評価として、2つのタンパク質が物理的に会合（結合）し、近距離となった時に出す発光シグナルを検出する「AlphaScreen システム」評価系の構築を行う。

その後、この系を用いて東大創薬機構から分与される化合物ライブラリーから阻害化合物を探索し、細胞実験で netrin-1 による細胞遊走、増殖阻害効果、または細胞内シグナルを阻害するか確認したい。

研究成果

(1) bisulfite 法による netrin-1 プロモーター解析

解析には大腸癌細胞株 6 種および正常ヒト腸管上皮細胞を用いた。ゲノムを抽出した後、bisulfite 処理を行った。図 1 に示すように、反応の成否を PCR 法によって確認した。その後、bisulfite 処理後のゲノムを用いて、netrin-1 プロモーター領域の一部(472bp)を認識するプライマーによって PCR を行い(図 2)、標的部位を増幅し、T-ベクターに導入し遺伝子配列を解析した。解析にはメチル化 CG 部位の割合を評価した。その結果、大腸癌細胞株#2 では 94.6%、#5 では 95.4%の CG がメチル化されていることが明らかとなった。

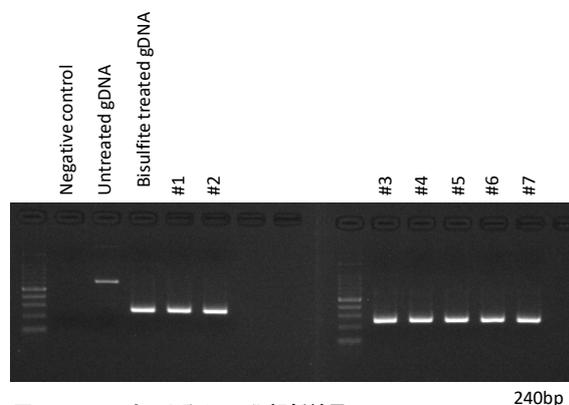


図1: bisulfite法によるメチル化解析結果-1
大腸癌細胞株6種および正常ヒト腸管上皮細胞から抽出したゲノムを用いてbisulfite処理を行い、反応の確認をPCRによって行った。

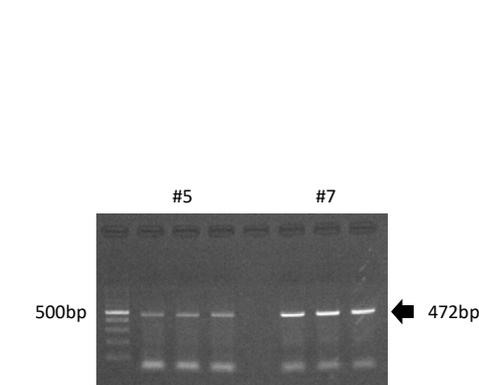


図2: bisulfite法によるメチル化解析結果-2
Bisulfite反応を確認したサンプル#5, 7に関して、netrin-1 プロモーター領域(472bp)をPCRによって増幅した。

(2) 小麦無細胞発現系とアルファスクリーンを用いたリガンド・レセプターの相互作用検出系の確立

Netrin-1 リガンド（全長）に flag タグを N-または C-末端に付加して、小麦無細胞発現系を用いて合成を行った。同時に netrin レセプターのひとつ UNC5C に biotin タグを付加して合成を行った。合成結果はウエスタンブロッティングによって合成の成否と分子量を確認した（図 3）。

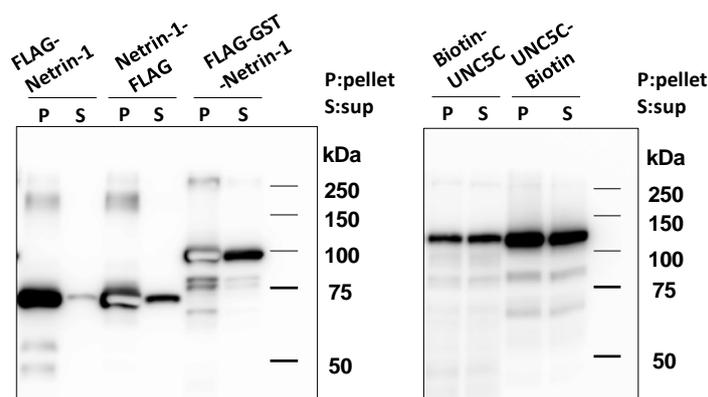


図3:コムギ無細胞タンパク質合成技術によるnetrin-1リガンド・レセプター合成
 Netrin-1リガンド(左)とレセプターUNC5C(右)のタンパク合成結果をウエスタンブロットにて確認した。

以上の合成タンパク質を用いて、リガンドとレセプターの結合を評価する alphascreen を行った。しかし、netrin-1 と UNC5C による結合は非常に弱い結果であった。一方で陽性コントロールである KCTD10-CUL3 結合では高い値が出ていたため alphascreen 自体は問題ないと考えられる（図 4）。

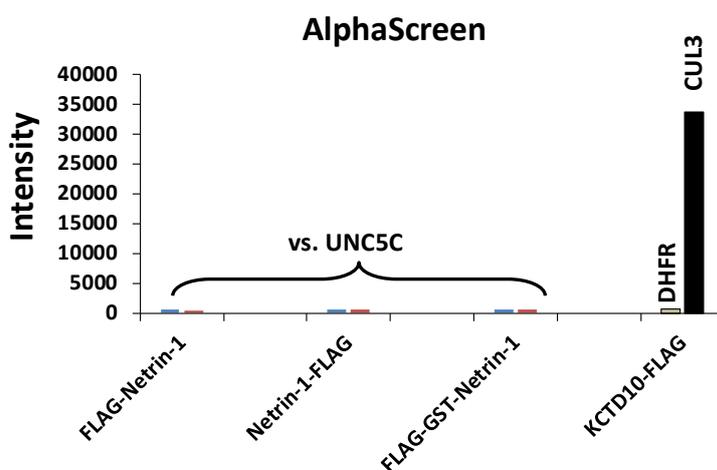


図4: AlphaScreen結果
 各種netrin-1リガンドとUNC5Cレセプターの組合せによる結果と実験のコントロールとしてKCTD10とDHFR (negative)またはCUL3 (positive control)を用いた。

成果発表

2020年度の国内学会にて発表を予定している。

今後の課題

Netrin シグナル阻害剤のスクリーニング系の作成は本研究において重要であるため、今後も引き続き行う予定である。今後は、netrin-1 全長から、レセプター結合に必要な最小部位に変更して再度 alphascreen を行う予定である。

また、大腸癌細胞を用いた netrin-1 遺伝子発現解析では、正常細胞との比較を行い、大腸癌細胞にてメチル化が促進されているかどうかを判定する予定である。